

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.043

· 专论与综述 ·

重组标签蛋白在蛋白质纯化中的研究进展*

崔超 呼延霆 尹大川[△]

(西北工业大学生命学院 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室 陕西 西安 710072)

摘要: 重组蛋白的表达纯化是研究蛋白质结构与功能的重要环节之一,表达重组蛋白宿主细胞的监测筛选和重组蛋白低水平可溶性表达、低回收率以及不稳定易水解等问题一直是蛋白质高通量纯化工艺中的难题。近年来,将多肽或蛋白质作为标签,与目标蛋白共表达的方法已经很大程度地解决了这一问题。因此,针对不同特性的蛋白质选择合适的标签纯化策略在重组蛋白纯化研究中是相当关键的环节。本文回顾了儿种传统标签蛋白的研究概况(His-tag, Arg-tag, Flag-tag, GST-tag, MBP-tag等),着重对近年来新开发的儿种标签蛋白(Si-tag, Halo-tag, Intein-CBD-tag, ELPs-tag等)进行了深入探讨,并对新标签蛋白在蛋白质纯化中的应用前景作以展望。

关键词: 重组蛋白; 标签蛋白; Si-tag; Halo-tag; Intein-CBD-tag; ELPs-tag

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)32-6372-07

Progress of Novel Tag Protein Fusions for the Recombinant Protein Purification*

CUI Chao, HU Yan-ting, YIN Da-chuan[△]

(Key Laboratory for Space Bioscience & Biotechnology, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi, 710072, China)

ABSTRACT: Recombinant protein expression and purification is one of the vital sections for structure determination and function study of proteins. Detection and selection of host strain containing target protein, low-yield recombinant protein expression by insolubility, low-recovery ratio, instability and proteolysis etc., which always lead to difficulties in high-throughput protein purification processes. Recently, the co-expression methods of target protein fused polypeptides or protein as tag have successfully overcome this problem to a large extent. Therefore, selecting appropriate tag of protein purification for various property of proteins is the key portion. In this paper, the progresses on several traditional tag proteins (His-tag, Arg-tag, Flag-tag, GST-tag, MBP-tag etc.) are reviewed. Moreover, several recently developed tag proteins (Si-tag, Halo-tag, intein-CBD-tag, ELPs-tag etc.) and the prospective in this field are also discussed.

Key words: Recombinant protein; Tag protein; Si-tag; Halo-tag; Intein-CBD-tag; ELPs-tag

Chinese Library Classification(CLC): Q784 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)32-6372-07

前言

蛋白质是生命的体现者,几乎所有疾病的发生都与蛋白质结构、功能的正常体现密切相关,市场上的绝大部分药物的作用靶点也都是通过蛋白质而发挥作用^[1]。运用基因重组技术生产重组蛋白是研究蛋白质结构与功能的有力手段,如今重组蛋白已经成功地在微生物(E.coli, Pich. Pastoris等)和动植物(CHO, COS, HEK等)宿主细胞中得到表达生产,但是作为异源蛋白在宿主细胞中表达纯化常常会遇到很多瓶颈问题,例如:表达的监测筛选较难,可溶性表达水平低或呈包涵体表达,不稳定易水解,以及蛋白质的翻译后修饰等问题^[2],这些也成为

蛋白质纯化的限制步骤。通过筛选宿主培养生长条件,改变表达系统等措施可以达到预期的结果^[3,4],其中一些必要的基因操作也大大地改善了蛋白表达纯化效果,如在目标蛋白的N端或C端融合一段多肽或蛋白质序列作为标签^[5]。后者在蛋白质的表达检测和纯化过程中提供了很大的帮助^[6,7]。

目前这些标签主要分为两类,一类称之为自发光标签,它们主要应用于目标蛋白表达代谢的动态监测,另一类就是主要辅助蛋白质分离纯化的亲和吸附标签。后者作用的发挥,起码要满足三个元素:带有标签的重组蛋白、标签的配体以及固定配体的基质。此外,这样的标签还要具备一下特征:a)满足一步吸附纯化;b)对蛋白质的空间结构和活性几乎不受影响;c)

* 基金项目:国家 973 基础研究项目(2011CB710905);国家自然科学基金项目(30971425)

作者简介:崔超(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:生物大分子结构与功能研究,电话:18220876260,E-mail:cuichaoc_50@mail.nwpu.edu.cn

△ 通讯作者:尹大川,E-mail:yindc@nwpu.edu.cn

(收稿日期:2013-12-08 接受日期:2013-12-31)

易于从目的蛋白上分离;d)有助于简单精确地分析;e)对大多数蛋白有适用性^[7]。正是这些标签蛋白(多肽)极大地简化了蛋白质的高通量纯化分析,但是针对复杂多变的蛋白质选择合适的标签也成为了该领域的一个关键问题。为了进一步改善突破蛋白纯化方法学的研究,人们也不断地尝试新的蛋白标签。本文在回顾总结几种传统蛋白标签的基础上,综述了几种新型标签(Si-tag, Halo-tag, 自剪切标签等),介绍了它们的原理和应用;与传统蛋白标签的对比,显示了它们更好更广的蛋白质纯化过程的适用性,探讨了不断出现的新型标签在蛋白质纯化中的前景。

1 传统标签蛋白研究概述

传统的蛋白(多肽)标签(His-tag, Arg-tag, Flag-tag等)主要是简化纯化步骤,由于它们是不足10个氨基酸残基的多肽,在很大程度上不太影响蛋白质的结构;标签蛋白(GST-tag, MBP-tag等)除简化了纯化步骤,更重要的是它们同目标蛋白融合表达能增加表达量和可溶性表达。

1.1 His-tag

早在1975年由Paroth J^[8]等人提出的金属螯合层析蛋白质纯化技术,最初利用 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 螯合纯化了人血清蛋白。如今已经发展地相当成熟并广泛应用,该方法是利用蛋白质的某些氨基酸残基(例如组氨酸(his)的咪唑基,半胱氨酸(cys)的巯基,色氨酸(trp)的吲哚基等)有较多的未配对核外电子特性,能与一些过渡态的金属离子(Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} 等)发生配位结合,形成化学键,暂时将目标蛋白肽链螯合固定在特定的基质配体上,然后改变基质所处环境(介质浓度、pH值等)将目标蛋白得以分离^[9]。

然而不同的配基和金属离子的组合让这种方法显得比较复杂。图1为固定化金属离子的特异性和配基的吸附性特性,图2为金属离子螯合层析的简图:

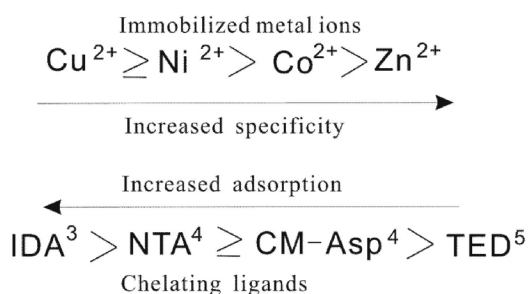


图1 金属离子和配体的特性比较^[10]

Fig. 1 comparison of properties of metal ions and ligands

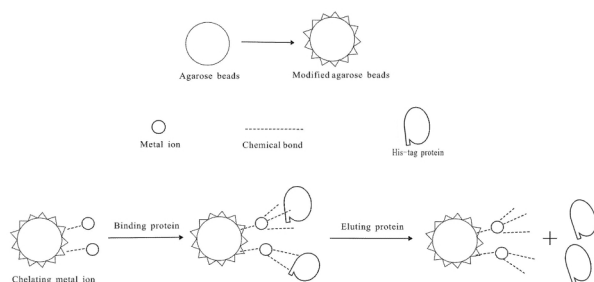


图2 金属离子螯合层析原理简图

Fig. 2 Schematic of Metal ions chelating chromatography

不同的金属离子参与反应需要选择不同的洗脱液(Elution Buffer),或改变溶液的pH或添加一些竞争性试剂^[10]。Hochuli E及其同事^[11]利用His6-tag金属螯合层析纯化了二氢叶酸还原酶,在后来成为了重组蛋白纯化主要方法之一。如今利用His-tag已经成功地应用于大肠杆菌,酵母,哺乳动物细胞等重组蛋白的表达纯化,而且纯化条件甚至可以在pH4~10范围内,高盐,强变性剂(如尿素,盐酸胍),非离子型变性剂等环境中正常进行^[10]。

1.2 Arg5,6-tag

精氨酸(Arg):的等电点 $\text{pI}=10.76$,它的胍基的酸度系数(pKa值)12.48,属于碱性氨基酸,在酸性,中性,偏碱性环境下都是带正电荷。Brewer SJ^[12]第一次描述了Arg6-tag在纯化尿抑胃激素中的应用。因为大多数*E.coli*的蛋白在pH5以上带负电荷,那么可以第一步通过阳离子交换层析在pH>5.5的溶液环境下纯化,然后在重组蛋白pI值的溶液环境下用羧肽酶B(和A)将Arg标签切除,最后再经过一次阳离子交换层析得到重组目标蛋白。但是羧肽酶B(和A)在酶切消化标签时也会产生一些非目标蛋白的产物,并且效率一般^[13]。该标签主要串联与其他标签一起发挥作用。

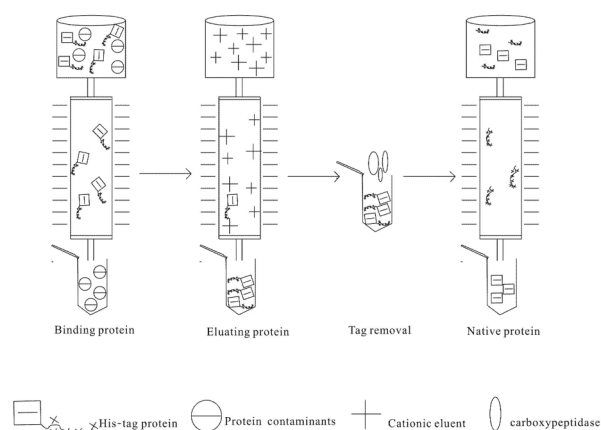


图3 Arg-tag 标签纯化蛋白的原理简图^[12]

Fig. 3 Schematic of arg-tag protein purification

1.3 FLAG-tag

FLAG-tag,即Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys,是专门用于蛋白检测和免疫亲和层析而设计的一个多肽序列。其中芳香族氨基酸Tyr是抗原抗体的识别的主要因素,在高极性环境中芳香族氨基酸产生作用的可能性高于在低极性环境中,位于N端的带负的天冬氨酸(Asp)可辅助Tyr的抗原性。多肽C端的六个氨基酸(Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)组成一个亲水序列,可能形成高度暴露的三维蛋白质构型,在理论上可使序列达到最大的亲水性,也就大大增强了FLAG融合标签的抗原性。迄今,有三种抗体(M1, M2和M5)用于该标签的结合, M1是 Ca^{2+} 依赖性的,只识别N端自由的FLAG-tag融合蛋白,可以用螯合剂EDTA洗脱蛋白; M2不依赖于 Ca^{2+} 发挥作用,可以识别N端和C端的融合蛋白,比较普遍使用,可以采用改变pH值和添加FLAG多肽竞争性地洗脱蛋白, Futatsumori-Sugai M^[14]等利用0.5-1M的Arginine-HCl,在pH3.5~4.4的洗脱条件下也很好得到了蛋白MsbA, JNK3, Caf.; M5也不依赖于 Ca^{2+} ,能

识别 N 端的 Met-FLAG-tag 的融合蛋白^[15,16]。

1.4 GST-tag

Smith DB^[17]第一次介绍了谷胱甘肽-S-转移酶(GST)作为融合标签用于在 *E.coli* 中表达纯化外源蛋白,26KDa 的 GST 是日本血吸虫编码的蛋白酶,可以融合在目标蛋白的 N-/C-端。GST 亲和层析是将还原性的 GSH 共价结合到琼脂糖凝胶树脂上,GST 通过与 GSH 相互作用将目标蛋白固定到树脂上。结合的重组蛋白用 10 mM 还原性谷胱甘肽在温和的条件下洗脱。Prescission 蛋白酶,凝血酶,或 Xa 因子可用于去除 GST 标签蛋白,可以选择蛋白结合在层析柱上时切割,或者洗脱下了在溶液中切割,最终得到活性蛋白。融合 GST 标签的策略常常依赖它增强重组蛋白的可溶性表达,但是与其他标签(MBP, NusA 等)相比,它的效果并不算最好^[18,19]。

1.5 MBP-tag

MBP (或麦芽糖结合蛋白)是大肠杆菌 K12 中基因 malE 的产物,由 396 个氨基酸组成,N 端有 26 个氨基酸的信号肽序列,约 40KDa,最终表达的 MBP 会被定位到细胞周质中。成熟的 MBP 分子与麦芽糖或麦芽糊精有特异的结合能力,以 α -1-4 糖苷键与(淀粉分子上的)葡萄糖单体同一侧的氧原子结合交联反应,这种排列是分子间氢键相互作用的关键。结合在麦芽糖(maltose)上的 MBP 融合蛋白最后可以通过 20-100 mM 的麦

芽糖竞争性地分离^[20,21]。

利用 MBP 蛋白这种定向表达的特性人们构建了几种表达载体,例如 pCG806,pMAL-c2 等将目标蛋白定向表达至细胞周质,而 pCG150,pMAL-p2 载体中的 malE 基因去除了信号肽的序列,可以将目标蛋白表达至细胞质。发现用 pMAL-c2 载体在细胞质中表达蛋白比用 pMAL-p2 载体在细胞周质的表达量多,不稳定的蛋白在细胞质中显得更加稳定,但是细胞质中是一个还原性的环境,表达的蛋白可能会发生错误得折叠(尤其对二硫键的形成)。而 pMAL-p2 载体表达蛋白于细胞周质中产量虽然低,但是促进了蛋白的正确折叠,并且细胞周质的杂蛋白较少,有利于目标蛋白的纯化^[22,23]。

MBP-tag 除了能提高重组蛋白的产量外,另一个重要的贡献是它能促进蛋白的可溶性表达。为了使 MBP-tag 与配体很好的结合,一般融合在目标蛋白的 C 端,Hewitt SN^[24]发现 95 个来源于原核、真核的蛋白基因在 *E. coli* T7 表达体系中无表达,但在 AVA-MBP 载体中表达时,62 %的重组蛋白得到可溶性表达。在体外凝血酶因子 Xa 可将标签切除,另外在毕赤酵母表达系统中 Dälken B^[25]介绍了一种通过佛林蛋白酶(furin)在体内完成切除标签的方法,进一步简化了纯化步骤。

综上,我们将传统的标签蛋白(多肽)的主要优缺点在表一列出。

表 1 传统的蛋白(多肽)标签的主要优缺点

Table 1 The main merits and demerits of traditional protein (peptides) tags

Tags	Merits	Demerits
His-tag	6~10 amino acid; Widespread applicability either in mild or denatured conditions(especially for recombinant protein purification in <i>E.coli</i>)	Expensive matrices; interference of host proteins in mammalian cells; Occurring metal ion transfer or MIT; Hidden in target protein without function .
Arg-tag	5~6 amino acid	non-specific or inefficient cleavage.
FLAG-tag	Small peptides; available to facilitate aspects of protein detection and immune-affinity chromatography purification	Expensive matrices; Low affinity, mild conditions; Preparation for antibody and FLAG peptides; non-specific or inefficient cleavage.
GST-tag	Enhancement of soluble expression	Metabolic burden; Less effect than other soluble tags
MBP-tag	Better enhancement of soluble expression	Metabolic burden; Loss of protein stability and solubility following tag removal

2 新型的标签蛋白研究进展

在蛋白质的纯化工艺中,追求重组蛋白的高产量,高纯度的同时,研究者也致力于探求更加高效低廉,高通量的实验技术。为了克服传统纯化方式的弊端,实现这一目标,更加优化简便、多功能的新型标签蛋白出现在这一领域,以下我们将重点介绍几种。

2.1 硅多肽标签(Si-tag)

已有报道很多多肽可以特异地结合到金属、金属氧化物和

半导体材料上,例如免疫球蛋白 G(B 结构域)可以聚集结合在金平板表面^[26],His6-tag 和 Arg9-tag 重组蛋白通过标签的特性固定到二氧化硅或玻璃表面^[27,28],但是这些特异结合的多肽通常与材料之间的亲和力较低,比较容易洗脱下来。后来发现了与固体表面有更强结合力的核糖体 L2 蛋白(即 Si-tag 蛋白)。消化 *Bacillus steurotlzermophilus* 的 23sRNA 和核糖体 L2 蛋白发现了 L2 蛋白的 RNA 结合域,而且是该蛋白的 N-端和 C-端各一部分表现出氨基转移酶活性位点^[29]。对 L2 蛋白结晶学研究发现完整的 L2 蛋白并不好结晶,而除去 N-端和 C-端的一

部分区域才容易地得到了晶体。这两端部分结构很类似于一些天然无序蛋白质的性质:缺少疏水性的氨基酸残基,还有大量极性或带电的氨基酸残基;遇到受体结合时,这些序列会诱导折叠和结合(coupled folding and binding),与受体形成更稳定的复合物^[30]。最近 Kuroda A^[31]等发现核糖体蛋白 L2 能以较大的结合力结合在氧化硅材料表面上。

L2 蛋白的 N 端 60 个氨基酸和 C-端的 71 个氨基酸带有大量的正电荷(Arg, Lys, His 等),等电点是 10.9。一些硅材料诸如硅片、玻璃载片等,当处于缓冲液中时外层的 SiO₂ 会产生如下的反应:SiO₂+H₂O→-SiOH, pKa=7; 在中性或碱性溶液中会有水解成 -SiO⁻ 和 H⁺ 离子,这样在材料外层就会聚集一层负电荷^[32,33]。Gao B^[34]等还指出 Diatomite(硅藻土)的等电点是 2.0,在 pH>2 时,硅藻土就带阴离子。所以,在 pH=2~8 范围内都能与硅标签蛋白有很强的亲和力。但是, Ikeda T^[33]分析硅材料与 L2 蛋白之间很强的吸附作用不仅仅是静电吸附作用。L2 蛋白结合到硅材料表面后,两端的无序肽段由范德华力引发多点的结合,随后肽链重排、构象改变,导致最初不可逆的吸附。在二级结构方面,人们发现 α 螺旋和 β 折叠结构减少,而无序结构的部分明显增多;隐藏在蛋白质核心区的非极性侧链暴露出来与硅材料表面的 hydrophobic siloxane site(-Si-O-Si-)发生疏水相互作用。以上这些变化共同促进吸附作用的发生。如图 4。

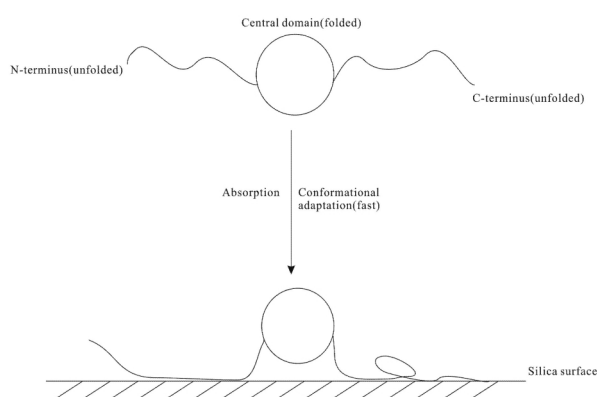


图 4 Si-tag 在硅材料表面形成不可逆的吸附原理简图^[33]

Fig. 4 Scheme describing protein irreversible adsorption to a silica surface

将 GFP 作为模式蛋白,与 L2 蛋白的全长(1-273aa)以及不同区段(N-端 1-60aa)、(61-202aa)、(C-端 203-273aa)、(1-60aa, 203-273aa)融合重组表达,发现 L2 蛋白在氧化硅表面的固定化作用,显示了很强的固定化吸附作用,起主要作用的是 L2 蛋白的两端区域结构,比同条件下 poly-Arg 的作用力甚至超出 20-100 倍^[31]。并且发现融合 Si-tag 的金黄色葡萄球菌蛋白 A 可以将免疫球蛋白 G 很好的定向固定到硅片上,活性是无 Si-tag 的 4~5 倍^[35]。纯化可溶性表达 Si-tag-ProteinA 时产量可达到 81%,纯度达到 86%,和 His-tag 纯化相比有相似的纯度、更高的产量^[32]。再者也可以在含有非离子变性剂(i.e., urea)中利用 Si-tag 纯化不溶性的包涵体表达重组蛋白 Si-tag-BAP(生物素受体),纯度和产量分别达到 93%、95%^[36]。Li J 等^[37]利用磁性羧甲基壳聚糖纳米颗粒纯化 L2(252-273)-SUMO-EGFP,得到高纯度的 EGFP 蛋白(93%),SUMO 作为增强可溶性表达和蛋白酶切割位点序列。

注意的是,洗脱 Si-tag 的重组蛋白需要添加二价镁离子,而后者可能会结合在硅颗粒表面,发生反应: -SiOH + M²⁺→ SiOM⁺ + H⁺,所以最后需要 1N HCl 处理再生硅颗粒。

综上,可以看出 Si-tag 有它很多优点:a) 与其他亲和层析相比硅颗粒可以充当 resin 和 ligand 的双重作用;b) 硅颗粒容易制备,并且不需要额外的化学修饰;c) 宿主(*E.coli*)自身蛋白极少与硅颗粒表面结合;d) 在较大的 pH 范围,高盐浓度,以及去垢剂(urea), DTT, EDTA 等纯化条件下均适用。但是,在如此强大的亲和力下,有可能会影响一些融合蛋白的活性。

2.2 Halo-Tag

Halo-tag 融合标签是 Promega 公司开发的,可以通过灵活的改变标记物用于体内蛋白质的荧光成像、动态监测,以及蛋白质纯化等众多的研究。该标签是从红球菌属(DhaA)表达的氯化烷脱卤素酶(约 34KDa)改造而来的,它能与氯化烷烃发生不可逆的共价结合,在氯化烷烃的一端可以连接不同功能性的基团,进而实现体内、体外的一些生物学实验^[38]。野生型的脱卤素酶(DhaA)催化氯化烷烃水解为相应的醇和卤氢。酶反应中心作用于脂肪烃链上的碳卤键, Asp106 亲核攻击碳卤键上的碳原子(亲核置换反应),形成一种过渡态的化合物,然后,受 His272 咪唑基的影响,水分子会将过渡态化合物水解为最终产物^[39]。改造后的这种酶是将 His272 突变为 Phe,与底物反应形成共价键,因为这个脂键在一个疏水的袋内,过渡态化合物将不被水解而稳定存在,再附加突变其他氨基酸残基使这种结合反应速度大大增加^[38, 40, 41]。

作为 Halo-tag 的配体氯化烷可以连接各种功能团,例如荧光素,亲和标签,固体支持物(即荧光配基 TMR, diAcFAM, 亲和反应基团生物素,磁性或非磁性树脂、玻璃载片(Glass slides)等),可以高效、特异、不可逆的共价结合于 Halo-tag 重组蛋白,完成活细胞或固定细胞的成像、将蛋白固定化捕获进而监测蛋白质与蛋白质,蛋白质与 DNA 复合物的定位及细胞生物学现象^[41-44]如图 5,表 2。Los GV 等利用 TMR 配体在 HeLa 细胞中监测了 p65-Halo Tag 受 TNF-α 刺激时表达移位以及 p65-Halo Tag 与 IκB 启动子、IκB 蛋白形成复合物的情况^[41]。Svendsen S. 等运用该技术研究了整合素在细胞表面的定位,转运和加工的过程,最后筛选得到稳定表达整合素蛋白的细胞系(池)^[42]。因此对 halo-tag 重组蛋白表达的准确实时检测可以为捕获目标蛋白提供很好的条件。

由于该标签与配体之间以很稳定的共价键结合,在蛋白纯化过程中可以用比较苛刻的洗脱条件排除未结合及非特异性结合蛋白质,还有具备有高效的反应特点,这些克服了基于平衡反应的限制因素,可以满足低水平蛋白表达的捕获,并且还发现该标签增强蛋白表达量和可溶性表达。在 *E.coli* 表达系统中 Ohana RF^[43]等以 23 种较难表达的人源蛋白(WM=9~155Kda)为研究对象,比较了 Halo-tag 与其他三种标签(MBP, GST, His)的优越性。以 Halo-tag 为标签表达时发现可溶性目标蛋白占 74%,而其他三种最高的 MBP-tag 仅占 52%。当蛋白分子量大于 60KDa 时, Halo-TAG 表达的可溶性蛋白占 37%,另外的仅有 MBP-tag 有表达占 12.5%。纯化其中 6 种蛋白时, Halo-tag 成功表达 5 种蛋白纯度 95%以上,其他标签中(GST-tag)成功表达 3 种纯度最高仅达到 62~84%。在哺乳动物细胞表达系

统中针对五种人源蛋白激酶 (PKCc, Src, PI3Kc, PKACa, Δ EGFR, MW= 40~126KDa) 用 Halo-tag 技术纯化, 结果 HEK293T 细胞得到每种蛋白产量在 75 %以上, 纯度在 95 %以上。相比之下 His-tag, FLAG-tag, 3 $\times$ FLAG-tag 得到产量是 30-60 %, 纯度在 70 %以下^[46]。另外, 利用 Halo-tag 技术可以简化多克隆抗体的制备。在获得抗原时, 传统的方法需要先活化柱子, 再让纯化好的抗原与柱子固定结合, 最后免疫血清流经亲和和住纯化所得多克隆抗体; 而现在可以利用 HaloLinkTM 树脂将结合柱与抗原的纯化过程同步进行, 进一步从免疫血清中得到多克隆抗体^[47]。最后, Halo-tag 从目标蛋白上去除是利用 Promega 公司的 TEA 酶, 该酶 N- 端含有 (HQ)₅-tag, 用 TEA 酶将蛋白洗脱下来后, 可以再经过 HisLinkTM Resin 把 TEA 酶去除, 回收目标蛋白。

综上, Halo-tag 技术拥有明显的优点: 脱卤素酶分子量相对较小, 在动植物细胞中不存在, 消除本体干扰; 反应的进行不需要其他因子参与或转录后修饰, 无论真核还是原核表达系统均可使用; 配体能很好的渗透到细胞内, 无毒性, 与其他蛋白几乎无交叉反应; 卤化烃配体可以多功能化; 形成的共价键相当稳定, 即使在一些比较严厉的环境下仍能保持; 克服纯化基于平衡反应的限制因素, 适应低水平表达蛋白和减少蛋白的丢失等等^[41, 46]。

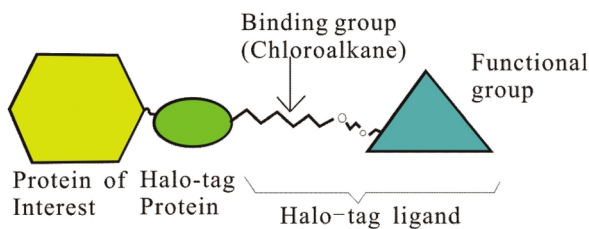


图 5 Halo-tag 重组蛋白技术^[44]

Fig. 5 Schematic of the HaloTag technology

表 2 不同的功能基团^[44]

Table 2 Different functional groups

Fluorescent ligands	Surfaces	Reactive ligands
Many different colors	Nonmagnetic	Attach functional
Cell permeable ligands	resin	group of choice
Cell non-permeable ligands	Magnetic resin	i.e. PET ligands,
	Glass slides	MR reagents...

2.3 带有自剪切功能标签

2.3.1 IMPACTTM system 内含肽介导的几丁质结合肽标签亲和纯化系统, Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag (IMPACT), 该纯化体系利用来自酿酒酵母或集胞藻 6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 的一段修饰的内含肽 (intein) 与几丁质结合结构域 (CBD) 耦合形成的一个亲和标签, 将目标蛋白连接到内含肽的 N-/C- 端, 最终在较低的温度下通过调节 pH 值或添加二硫苏糖醇 (DTT)、 β - 巯基乙醇或半胱氨酸等将标签去除^[48, 49]。Zhang A 等^[50]将 mini-intein (20-30KDa) 融合以 GFP 灵活地检测蛋白可溶性表达, 纯化得到的蛋白纯度达到 90 %以上。Sun L 等^[51]通过硫酯键将内含

肽的抗原固定在 CBD 树脂上, 作为一种纯化抗体的新方法。但是, IMPACTTM system 纯化蛋白有一个缺点是蛋白回收率偏低, Cui C 等^[52]研究发现并不是蛋白的表达水平低, 而是表达的蛋白绝大部分在体内发生了 intein 介导的标签自剪切过程。他们采用定点突变的方法将 intein 的 N 端自由态巯基参与形成二硫键, 消除了体内表达后自剪标签的事件, 如图 6 所示。该体系最大的优点是避免了运用蛋白酶法带来的问题, 如切割的效率低, 非特异性的切割以及蛋白酶的分离。

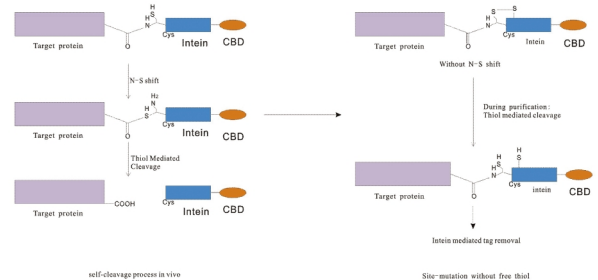


图 6 定点突变防止体内自剪切^[52]

Fig. 6 Site-mutation against self-cleavage

2.3.2 Elastin-like peptides tag 类弹性蛋白多肽, Elastin-like peptides, ELPs 是指 (Val-Pro-Gly-Xaa-Gly)_n, Xaa 是除了脯氨酸以外的任意氨基酸, n 在 20-330 之间。该序列可发生逆相变循环的过程, 即在低于相变温度 T_t 时, 多肽会以可溶形式存在, 当高于 T_t 时, 多肽会发生聚集, 温度回复后又会解聚可溶, 如图 7。而 T_t 的值主要由 Xaa 的组成和长度决定, 此外还会受到 ELPs 浓度, 融合蛋白的分子量大小、溶剂成分、离子强度的影响^[53-55]。Conley AJ^[56]等指出在植物表达系统中 ELPs 标签增强了重组蛋白的表达, 30 个 Val-Gly-Val-Pro-Gly 重复序列或许是最好的选择。

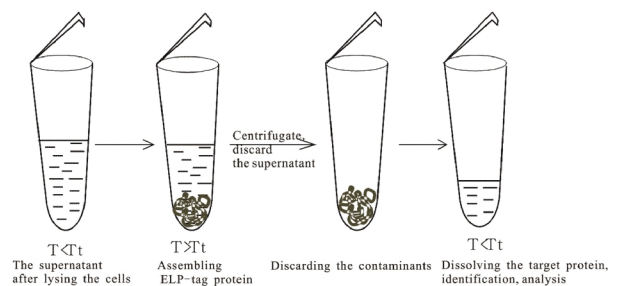


图 7 ELP- 重组蛋白纯化简图

Fig. 7 Schematic of ELP-tag protein purification

后来有人将 Δ I-CM intein 与 ELPs 标签耦合在一起, 目标蛋白紧随在 intein 的 C 端, 形成了一个新的蛋白纯化策略 (又称自剪切聚集标签), 如此 ELPs 可以在最后切除掉得到天然蛋白质, 纯化的步骤就是增加了一次在 pH 或 DTT 参与调节下的相变循环^[57-59]。为了防止 intein 的体内自剪切事件, Shi C 等^[60]将 ELPs 的 C 端分别与分开的 intein 蛋白的两段融合, 即 N 端 110 个氨基酸和 C 端个 58 氨基酸, C- 端片段失去剪切活性, 目标蛋白再与后者的 C 端融合, 得到“分离 intein 的双 ELPs 标签纯化体系”。该体系是先让两个表达框同时转录翻译蛋白, 之后

在体外通过相变循环纯化剪切标签,如图 8。

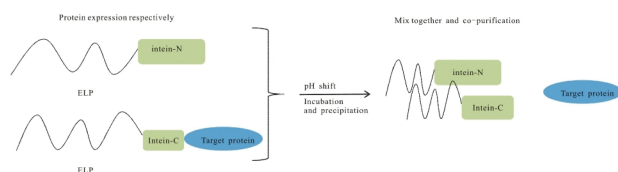


图 8 自剪切聚集标签^[60]

Fig. 8 Self-cleaving and assembled tag protein

除了 intein 自身的特性外这种标签蛋白的优点还表现在:
a)省去了亲和纯化的昂贵设备;b)蛋白的分离操作基本上可以通过离心、超滤、改变温度、离子强度来完成;c)允许较高温度以可溶形式表达外源蛋白,这样适合在真核表达系统中得到应用等^[53,60]。

如前面所述,在蛋白质纯化流程中新型的标签蛋白比传统的标签显示出一些明显的优越性,如更充分地将杂蛋白分离去除;更加简化的纯化步骤;更加广泛的适用性等等。当然对于潜在的弊端,研究者则要根据自己的实验条件和目的对这些标签做出合适的选择。

3 展望

基因重组技术可以让使目标蛋白在宿主细胞中大量表达,标签蛋白更是极大方便了重组蛋白的整个纯化环节,提高了蛋白的稳定性、可溶性,可以通过较简单的操作得到高产量高纯度的目标蛋白。由于蛋白质的性质各不相同以及研究目的的不同,传统的标签蛋白不能很好地展示在融合蛋白的表面而失去它的作用,而且有些标签与目标蛋白分离后,后者立即聚集不利于下游研究工作,选择合适的标签蛋白融合表达系统就成为目标蛋白质表达纯化的一个重要的瓶颈问题。近年来,研究者将不同的标签串联在一起(即串联亲和和标签),发挥各自在纯化过程中的优势对于部分蛋白也有不错的效果^[60]。其次,开发新型多功能的标签也是很好的解决途径,如人们对贻贝类的足丝蛋白研究发现了 DOPA 分子的黏附机制,正在探索 DOPA-tag 的可行性^[60]。这些新型标签不但满足了蛋白纯化的一般要求,而且能够灵敏准确的检测蛋白表达情况,制备蛋白芯片,为下游的纯化筛选出更好的条件。因此,蛋白质组学的研究让我们有更多的机会去了解蛋白质结构与功能的关系,我们相信更加优化的蛋白质标签以及新颖的标签技术会更好的服务于重组蛋白纯化领域。

参考文献(References)

- [1] Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(10):821-834
- [2] Yin J, Li G, Ren X, et al. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes [J]. *J Biotechnol*, 2007, 127(3): 335-347
- [3] Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1102-1107
- [4] Khoo O, Suntrarachun S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2(2):159-162
- [5] Stevens RC. Design of high-throughput methods of protein production [J]. *Structure*, 2000, 8(9):R177-185
- [6] Waugh DS. Making the most of affinity tags [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(6):316-320
- [7] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60(5):523-533
- [8] Porath J, Carlsson J, Olsson I, et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation [J]. *Nature*, 1975, 258(5536):598-599
- [9] Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography [J]. *Protein Expr Purif*, 1992, 3(4):263-281
- [10] Chaga GS. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography past, present and future [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, 49(1-3):313-334
- [11] Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, et al. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent[J]. *Nat Biotechnol*, 1988, 6:1321-1325
- [12] Brewer SJ, Sassenfeld HM. The purification of recombinant proteins using C-terminal polyarginine fusions [J]. *Trends Biotechnol*, 1985, 3(5):119-122
- [13] Nagai K, Th gersen HC. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*[J]. *Methods Enzymol*, 1987, 153:461-481
- [14] Futatsumori-Sugai M, Abe R, Watanabe M, et al. Utilization of Arg-elution method for FLAG-tag based chromatography [J]. *Protein Expr Purif*, 2009, 67(2):148-155
- [15] Hopp TP, Prickett KS, Price VL, et al. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification[J]. *Biotechnology*, 1988, 6:1204-1210
- [16] Einhauser A, Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, 49(1-3):455-465
- [17] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase [J]. *Gene*, 1988, 67(1):31-40
- [18] Hammarström M, Hellgren N, van Den Berg S, et al. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*[J]. *Protein Sci*, 2002, 11(2):313-321
- [19] Dyson MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, et al. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression[J]. *BMC Biotechnol*, 2004, 4:32
- [20] Duplay P, Bedouelle H, Fowler A, et al. Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12[J]. *J Biol Chem*, 1984, 259(16):10606-10613
- [21] Pattenden LK, Thomas WG. Amylose affinity chromatography of maltose-binding protein: purification by both native and novel matrix-assisted dialysis refolding methods [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 421:169-189
- [22] Riggs P. Expression and Purification of Maltose-Binding Protein

- Fusions[J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2001, Chapter 16:Unit16.6
- [23] di Guan C, Li P, Riggs PD, et al. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein[J]. *Gene*, 1988, 67(1):21-30
- [24] Hewitt SN, Choi R, Kelley A, et al. Expression of proteins in *Escherichia coli* fusions with maltose-binding protein to rescue non-expressed targets in a high-throughput protein-expression and purification pipeline [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2011, 67(Pt 9):1006-1009
- [25] Dälken B, Jabulowsky RA, Oberoi P, et al. Maltose-binding protein enhances secretion of recombinant human granzyme B accompanied by in vivo processing of a precursor MBP fusion protein [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e14404
- [26] Kanno S, Yanagida Y, Haruyama T, et al. Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization[J]. *J Biotechnol*, 2000, 76(2-3):207-214
- [27] Cha T, Guo A, Zhu XY. Enzymatic activity on a chip: The critical role of protein orientation[J]. *Proteomics*, 2005, 5(2):416-419
- [28] Fuchs SM, Raines RT. Polyarginine as a multifunctional fusion tag [J]. *Protein Sci*, 2005, 14(6):1538-1544
- [29] Watanabe K, Kimura M. Location of the binding region for 23S ribosomal RNA on ribosomal protein L2 from *Bacillus stearothermophilus*[J]. *Eur J Biochem*, 1985, 153(2):299-304
- [30] Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(3):197-208
- [31] Taniguchi K, Nomura K, Hata Y, et al. The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(6):1023-1029
- [32] Ikeda T, Ninomiya K, Hirota R, et al. Single-step affinity purification of recombinant proteins using the silica-binding Si-tag as a fusion partner[J]. *Protein Expr Purif*, 2010, 71(1):91-95
- [33] Ikeda T, Kuroda A. Why does the silica-binding protein “Si-tag” bind strongly to silica surfaces Implications of conformational adaptation of the intrinsically disordered polypeptide to solid surfaces [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 86(2):359-363
- [34] Gao B, Jiang P, An F, et al. Studies on the surface modification of diatomite with polyethyleneimine and trapping effect of the modified diatomite for phenol[J]. *Appl Surf Sci*, 2005, 250(1-4):273-279.
- [35] Ikeda T, Hata Y, Ninomiya K, et al. Oriented immobilization of antibodies on a silicon wafer using Si-tagged protein A [J]. *Anal Biochem*, 2009, 385(1):132-137
- [36] Ikeda T, Motomura K, Agou Y, et al. The silica-binding Si-tag functions as an affinity tag even under denaturing conditions [J]. *Protein Expr Purif*, 2011, 77(2):173-177
- [37] Li J, Dong Y, Zhang Y, et al. Purification of recombinant EGFP by fusion with L2 (252-273) from ribosomal protein L2 using magnetic particles [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 917-918:30-35
- [38] Los GV, Wood k. The HaloTag : A novel technology for cell imaging and protein analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 356:195-280
- [39] Janssen DB. Evolving haloalkane dehalogenases[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(2):150-159
- [40] Pries F, Kingma J, Krooshof GH, et al. Histidine 289 is essential for hydrolysis of the alkyl-enzyme intermediate of haloalkane dehalogenase[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(18):10405-10411
- [41] Los GV, Encell LP, McDougall MG, et al. HaloTag a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(6):373-382
- [42] Svendsen S, Zimprich C, McDougall MG, et al. Spatial separation and bidirectional trafficking of proteins using a multi-functional reporter[J]. *BMC Cell Biol*, 2008, 9:17
- [43] Kosaka N, Ogawa M, Choyke PL, et al. In vivo stable tumor-specific painting in various colors using dehalogenase-based protein-tag fluorescent ligands[J]. *Bioconjug Chem*, 2009, 20(7):1367-1374
- [44] Urh M, Rosenberg M. Halo tag, a platform technology for protein analysis[J]. *Curr Chem Genomics*, 2012, 6: 72-78
- [45] Ohana RF, Encell LP, Zhao K, et al. HaloTag7:A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification[J]. *Protein Expr Purif*, 2009, 68(1): 110-120
- [46] Ohana RF, Hurst R, Vidugiriene J, et al. HaloTag-based purification of functional human kinases from mammalian cells [J]. *Protein Expr Purif*, 2011, 76(2):154-164
- [47] Hata T, Nakayama M. Rapid single-tube method for small-scale affinity purification of polyclonal antibodies using HaloTag Technology[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(4):679-682
- [48] Chong S, Mersha FB, Comb DG, et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element[J]. *Gene*, 1997, 192(2):271-281
- [49] Mathys S, Evans TC, Chute IC, et al. Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements facile production of protein building blocks for protein ligation[J]. *Gene*, 1999, 231(1-2):1-13
- [50] Zhang A, Gonzalez SM, Cantor EJ, et al. Construction of a mini-intein fusion system to allow both direct monitoring of soluble protein expression and rapid purification of target proteins [J]. *Gene*, 2001, 275(2):241-252
- [51] Sun L, Ghosh I, Xu MQ. Generation of an affinity column for antibody purification by intein-mediated protein ligation [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 282(1-2):45-52
- [52] Cui C, Zhao W, Chen J, et al. Elimination of in vivo cleavage between target protein and intein in the intein-mediated protein purification systems[J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 50(1):74-81
- [53] Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(11):1112-1115
- [54] Meyer DE, Chilkoti A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3):846-851
- [55] Fong BA, Wu WY, Wood DW. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution [J]. *Protein Expr Purif*, 2009, 66(2):198-202
- [56] Conley AJ, Joensuu JJ, Jevnikar AM, et al. Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(3): 562-573

- Medical Education, 2011, 10(5): 568-569
- [14] Lon J. Van Winkle, Susan Cornell, Nancy Fjortoft, et al. Critical Thinking and Reflection Exercises in a Biochemistry Course to Improve Prospective Health Professions Students' Attitudes Toward Physician-Pharmacist Collaboration [J]. Am J Pharm Educ, 2013, 77(8): 169
- [15] 李文春, 李静, 王配军, 等. 医学课程 PBL 教学评价体系的构建与应用[J]. 中华医学教育探索杂志, 2011, 2(10): 170-172
Li Wen-chun, Li Jing, Wang Pei-jun, et al. Construction and application of evaluation system of PBL teaching for medical courses[J]. Researches in Medical Education. 2011, 2(10): 170-172
- [16] Ian J. Quitadamo, Martha J. Kurtz. Learning to Improve: Using Writing to Increase Critical Thinking Performance in General Education Biology[J]. CBE Life Sci Educ, 2007, 6(2): 140-154
- [17] Esmat Noohi, Maryam Karimi-Noghondar, Aliakbar Haghdoost. Survey of critical thinking and clinical decision making in nursing student of Kerman University [J]. Iran J Nurs Midwifery Res, 2012, 17(6): 440-444
- [18] 韩勇, 李小飞, 黄立军, 等. PBL 和 LBL 相结合的双轨教学法在胸外科临床教学中的效果评估 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(28): 5594-5597
Han Yong, Li Xiao-fei, Huang Li-jun, et al. Effect evaluation of PBL and LBL teaching methods in the clinical teaching of thoracic surgery [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(28): 5594-5597
- [19] Seyed Saeed Mazloomi Mahmoodabad, Haidar Nadrian, Hossein Nanghi. Critical thinking ability and its associated factors among pre-clinical students in Yazd Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences[J]. Med J Islam Repub Iran, 2012, 26(2): 50-57
- [20] 韩勇, 李小飞, 黄立军, 等. PBL 教学法在胸外科临床操作技能教学中应用的研究[J]. 浙江临床医学, 2012, 14(11): 1427-1428
Han Yong, Li Xiao-fei, Huang Li-jun, et al. Research Study of PBL teaching methods in the clinical operation skill teaching of thoracic surgery[J]. Zhejiang Clinical Medicine, 2012, 14(11): 1427-1428
- [21] Robert M. Cisneros. Assessment of Critical Thinking in Pharmacy Students[J]. Am J Pharm Educ, 2009, 73(4): 66
-
- (上接第 6378 页)
- [57] Ge X, Yang DS, Trabbic-Carlson K, et al. Self-cleavable stimulus responsive tags for protein purification without chromatography [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(32):11228-11229
- [58] Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags [J]. Nat Methods, 2005, 2(9):659-661
- [59] Wu WY, Mee C, Califano F, et al. Recombinant protein purification by self-cleaving aggregation tag[J]. Nat Protoc, 2006, 1(5):2257-2262
- [60] Shi C, Meng Q, Wood DW. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(2):829-835
- [61] Puig O, Caspary F, Rigaut G, et al. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification [J]. Methods, 2001, 24(3):218-229
- [62] Lee H, Scherer NF, Messersmith PB. Single-molecule mechanics of mussel adhesion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(35): 12999-3003
- [63] Laub M, Jennissen HP. Development of an universal affinity fusion tag (Poly-DOPA) for immobilizing recombinant proteins on biomaterials[J]. Materialwiss Werkst, 2007, 38(12):1035-1039